



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

EVALUACIÓN DE MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE SISTEMAS MICELARES DE TWEEN 80 QUE ENCAPSULAN ACEITES ESENCIALES

Delmonte, Agustina^{1,2}

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina, CONICET.

²Área de Biocoloides y Nanotecnología, Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, 1 de Mayo 3250, Santa Fe (3000), Argentina.

Director: Dr. Perez, Adrián

Codirectora: Dra. Visentini, Flavia

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Sistemas micelares, Tween 80, Aceites esenciales.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AEs) se caracterizan por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes, por lo que podrían ser utilizados como alternativa a tratamientos farmacológicos (Tariq y col., 2019). Su directa incorporación en la formulación de productos presenta una serie de inconvenientes asociados a su hidrofobicidad, volatilidad y susceptibilidad al oxígeno y la luz (Delshadi y col., 2020). Para sortear estos inconvenientes, los AEs deben ser encapsulados.

Diferentes métodos de encapsulación han sido estudiados, destacándose los sistemas micelares (SMs) por su originalidad y versatilidad. Los SMs se definen como sistemas formados por agua, aceite y, por lo menos un compuesto tensioactivo, que se presentan formando una solución líquida simple, ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable. En principio, se forman espontáneamente cuando los ingredientes adecuados se mezclan en condiciones óptimas sin requerir excesiva energía mecánica. Sin embargo, en la práctica a menudo es necesario aplicar algún tipo de procesamiento (McClements, 2015). Una de las ventajas de los SMs es que su tamaño nanométrico (10-100nm) permite su incorporación en la formulación de diversos productos sin comprometer sus propiedades fisicoquímicas (Lesmes & McClements, 2009).

La inocuidad de los SMs es el punto más importante a considerar para su aplicación en la industria farmacéutica y/o alimenticia. En este sentido, se prefieren los tensioactivos no iónicos por su baja toxicidad e irritabilidad (ej. los polisorbatos o Tweens) (Chatzidaki y col., 2019). Por otro lado, los cotensioactivos más utilizados son los alcoholes alifáticos (ej. etanol, isopropanol, etc.) y los polioles (ej. glicerol, polietilenglicol, etc.) ya que incrementan la flexibilidad y movilidad de la película interfacial, disminuyen la energía de enlace y regulan el balance hidrofílico-lipofílico, favoreciendo la obtención de SMs (Fanun, 2008).

OBJETIVOS

- Evaluar dos métodos de obtención de SMs como nanoestructuras capaces de encapsular AE de orégano (AEO) y AE de tomillo (AET). El primer método consiste en la obtención de SMs con un proceso que involucra baja energía mecánica (SMs-1) y el segundo en el desarrollo de SMs con un proceso basado en alta energía mecánica (SMs-2).
- Estudiar el tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación de SMs-1 y SMs-2.

Título del proyecto: Impacto de la matriz alimentaria y la nanoencapsulación sobre la bioaccesibilidad y actividad antidiabética de compuestos bioactivos.

Instrumento: PICT.

Año convocatoria: 2017.

Organismo financiador: ANPCyT.

Directora: MSc. Liliana Gabriela Santiago.

- Evaluar y comparar la estabilidad de los SMs durante 30 días de almacenamiento.
- Analizar la morfología y la capacidad de solubilización de los SMs.

METODOLOGÍA

Obtención de SMs por el método basado en baja energía mecánica

Para la obtención de SMs-1 se añadieron 0,4g de una solución de AE en etanol (50% p/p) a soluciones acuosas con cantidades variables de Tween 80, dando lugar a relaciones de Tween80/AE (SOR) de 0,05 a 1 p/p. Luego, las muestras se agitaron en vortex por 30s y se almacenaron a temperatura ambiente (Sedaghat Doost y col., 2020).

Obtención de SMs por el método basado en alta energía mecánica

Para la obtención de SMs-2 se preparó una pre-emulsión con AE (5% p/p), etanol (5% p/p) y Tween 80 (2,5% p/p), y se homogeneizó a 15000 rpm durante 5 min, usando un agitador de alta velocidad. Luego se titularon alícuotas de la pre-emulsión en soluciones de Tween 80 (1% p/p) para obtener SMs-2 con un rango de concentración final de AE de 0,0125 a 3% p/p (Rao & McClements, 2012).

Solubilización de AEO y AET en micelas de Tween 80

Luego de 24hs de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C), se determinó la turbidez de SMs-2 a 600nm por espectrofotometría. La capacidad máxima de solubilización (C_{sat}) de AE en las micelas de Tween 80 se definió como la concentración de AE donde se interceptan dos líneas rectas trazadas a partir de los datos de concentraciones de aceite relativamente bajas y altas (Rao & McClements, 2012). Esta determinación no pudo hacerse para SMs-1 debido a la heterogeneidad de los sistemas.

Tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula (PSD) se obtuvo mediante dispersión de luz dinámica (DLS) empleando un equipo Zetasizer Nano ZS90. El diámetro hidrodinámico (d_H) se obtuvo de la curva Intensidad (%) vs diámetro (nm). El tamaño de partícula se evaluó a los días 1, 7, 14 y 30 de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C).

Eficiencia de encapsulación (EE)

En primer lugar, se realizó una curva estándar de AE en n-hexano. Luego, para determinar la EE se midió el AE libre y total. Para determinar AE libre se realizó una extracción con n-hexano y posterior medición de absorbancia por espectrofotometría a 281nm para AEO y 273nm para AET. Para determinar AE total, fue necesario romper la estructura micelar previamente, por lo tanto, los SMs se mezclaron con metanol y se agitó 10 s en vortex. Luego, se procedió de igual manera que para la determinación de AE libre. La EE se calculo con la siguiente ecuación

$$EE (\%) = \frac{AE\ Total - AE\ Libre}{AE\ Total} \times 100 \quad (Eq. 1)$$

La EE se estudió al día 1, 7, 14 y 30 de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C).

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Alícuotas de cada muestra se adsorbieron a una superficie de mica (1 cm²) mediante un

secado en cámara de vacío a temperatura ambiente. La obtención de imágenes de AFM se realizó en modo "tapping" utilizando un microscopio Agilent 5400 (EE.UU.). Para procesar las imágenes se utilizó el software Gwyddion 2.44.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se calcularon los promedios y las desviaciones estándar. Las diferencias estadísticas se determinaron a través del análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el software Stat Graphics Plus 3.0. Para ello se aplicó la prueba Tukey HSD con un 95% de nivel de confianza.

RESULTADOS

Solubilización de AEO y AET en micelas de Tween 80

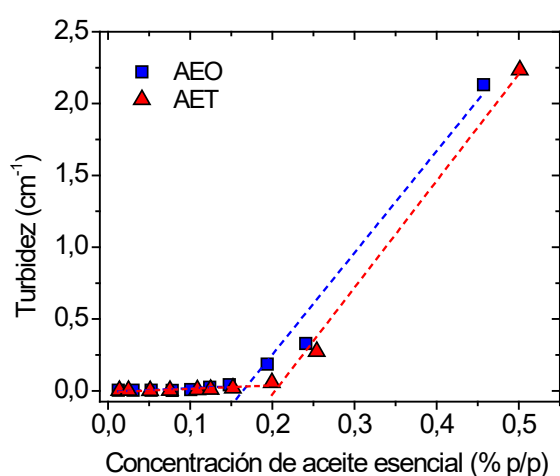


Figura 1. Determinación de C_{sat} .

La capacidad máxima de solubilización (C_{sat} , determinada a partir de la intersección de las dos rectas de la Figura 1) fue $0,17 \pm 0,01\%$ para AEO y $0,21 \pm 0,01\%$ para AET. Por debajo de la C_{sat} , el AE probablemente fue solubilizado por las micelas de Tween 80, lo que resultó en valores bajos de turbidez y una apariencia translúcida. Por encima de la C_{sat} , las micelas posiblemente estaban saturadas con AE, y el aceite remanente estaba disperso como gotas de AE, mostrando altos valores de turbidez y una apariencia turbia y opaca.

Tamaño de partícula

Los SMS-1 que encapsularon AET presentaron un d_H que osciló entre 28 y 59 nm a 1 día de almacenamiento, mientras que con AEO, el tamaño estuvo entre 24 y 68 nm. Por otro lado, para ambos AEs y para todos los SOR se produjo un aumento significativo de tamaño de partícula después de 30 días de almacenamiento ($p < 0.05$).

Los SMS-2 al día 1 de almacenamiento presentaron un d_H que osciló entre 8,5 y 12,4 nm para AET y entre 10,3 y 16,9 nm para AEO. Además, la mayoría de los SMS-2 cargados con AET se mantuvieron estables durante el almacenamiento. Por otro lado, para SMS-2 que encapsularon AEO, se observó que la mayoría de los sistemas no mostraron diferencias significativas en el tamaño de partícula durante 14 días de almacenamiento ($p > 0.05$).

Eficiencia de encapsulación

La EE de los SMS-1 varió ampliamente con el SOR. En el caso de SMS-1 cargados con AET, la EE más baja fue de 20% para SOR 0,5, y la más alta fue de 66% para SOR 0,1. Para SMS-1 cargados con AEO, la variabilidad fue menor y los valores de EE encontrados fueron mayores, entre 68 y 86%. Después de 30 días de almacenamiento la EE de SMS-1 permaneció igual ($p > 0.05$) o disminuyó ($p < 0.05$).

En cuanto a SMS-2 cargados con AET y AEO, se observaron valores de EE altos, alrededor del 88% en todas las concentraciones probadas a 1 día de almacenamiento. Después de 30 días de almacenamiento, se observó un aumento significativo en la EE de la mayoría de SMS-

2 que contenían AET ($p < 0,05$). Mientras que la mayoría de los SMs-2 que contenían AEO no mostraron diferencias significativas en la EE durante el tiempo de almacenamiento ($p > 0,05$).

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Las imágenes topográficas de AFM de SMs-1 cargados con AEO y AET mostraron partículas redondeadas con gran heterogeneidad, aglomeración y tamaño variable. Por el contrario, en el caso de los SMs-2 cargados con AEO y AET, se observaron partículas de menor tamaño, distribución homogénea y forma esférica.

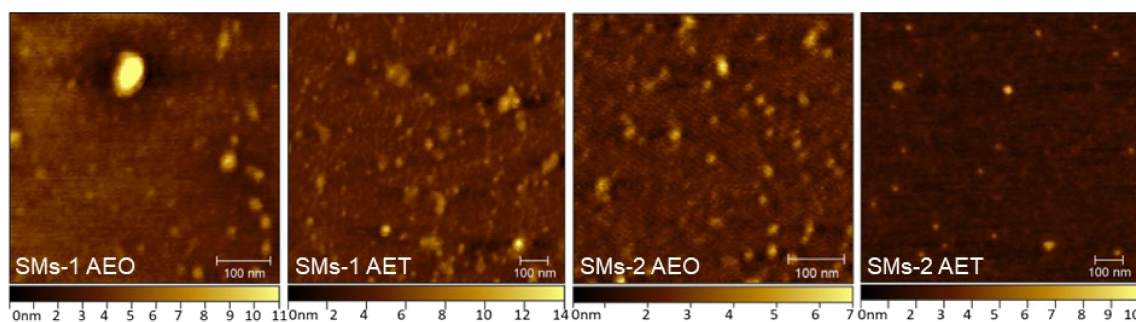


Figura 2. Imágenes topográficas de microscopía de fuerza atómica (AFM).

CONCLUSIONES

Como conclusión, el método que aplica alta energía mecánica resultó ser el más eficiente en términos de tamaño de partícula, estabilidad en el tiempo y encapsulación de AE. Este método permitió obtener SMs estables de forma fácil, rápida y con equipos altamente disponibles en la industria. Por lo tanto, los SMs-2 constituyen una alternativa prometedora para la encapsulación de AEO y AET con el fin de explotar sus propiedades bioactivas para futuras aplicaciones farmacéuticas y alimentarias.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Chatzidaki, M. D., Papadimitriou, V., & Xenakis, A.** (2019). Encapsulation of food ingredients by microemulsions. *Lipid-Based Nanostructures for Food Encapsulation Purposes: Volume 2 in the Nanoencapsulation in the Food Industry series*. Elsevier Inc.
- Coimbra, A., Ferreira, S., & Duarte, A. P.** (2022). Biological properties of *Thymus zygis* essential oil with emphasis on antimicrobial activity and food application. *Food Chemistry*, 393, 133370.
- Delshadi, R., Bahrami, A., Tafti, A. G., Barba, F. J., & Williams, L. L.** (2020). Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. *Trends in Food Science and Technology*, 104(July), 72–83.
- Fanun, M.** (2008). Phase behavior, transport, diffusion and structural parameters of nonionic surfactants microemulsions. *Journal of Molecular Liquids*, 139(1–3), 14–22.
- Lesmes, U., & McClements, D. J.** (2009). Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends in Food Sci. Technol.*, 20(10), 448–457.
- McClements, D. J.** (2015). *Surfactant-Based Delivery Systems Nanoparticle and Microparticle based delivery systems*. CRC Press; Taylor & Francis Group., 149–190.
- Rao, J., & McClements, D. J.** (2012). Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 268–276.
- Sedaghat Doost, A., Devlieghere, F., Stevens, C. V., Claeys, M., & Van der Meer, P.** (2020). Self-assembly of Tween 80 micelles as nanocargos for oregano and trans-cinnamaldehyde plant-derived compounds. *Food Chemistry*, 327(October 2019), 126970.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A.** (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 134(June), 103580.